Aus der Abteilung für Experimentelle Chirurgie und Immunologie
Direktor: Professor Dr. G. Riethmüller
der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen

Untersuchung über die Natur des T Zell-Rezeptors. Hemmversuche mit anti-Maus-Immunglobulin- und anti-Mausthymus- Antikörpern in einer Mikro-Kurzzeit Modifikation des ^{51}Cr-Release-Tests.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Müller-Schwefe
aus Dußlingen

1977

Aus der Abteilung für Experimentelle Chirurgie und Immunologie
Direktor: Professor Dr. G. Riethmüller
der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen

Untersuchung über die Natur des T Zell-Rezeptors. Hemmversuche mit anti-Maus-Immunglobulin- und anti-Mausthymus- Antikörpern in einer Mikro-Kurzzeit Modifikation des ^{51}Cr-Release-Tests.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Müller-Schwefe
aus Dußlingen

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

	Dekan:	Professor Dr. R.Lempp
1.	Berichterstatter:	Professor Dr. G.Riethmüller
2.	Berichterstatter:	Professor Dr. H.-J.Gerth

I N H A L T

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL und METHODEN	
	1. Tumor	3
	a) Herkunft	
	b) Transplantation	
	2. Tiere	
	3. Medien	4
	4. Herstellung von Kaninchen-anti-Maus-IgG-Serum	5
	a) Maus IgG Präparation	
	b) Immunisierung von Kaninchen	
	c) Gewinnung von KaMIgG-Serum	6
	5. Präparation der Immunglobulin-Fraktion	
	a) Immunoadsorbens	
	b) Ionenaustauschchromatographie	
	6. Kaninchen-anti-Mausthymus IgG	7
	7. Proteinbestimmung	8
	8. Immunelektrophorese	
	9. Reagenzgefäße	
	10. Testsystem	9
	a) Milzzellpräparation	
	b) Tumorzellpräparation	10
	c) ^{51}Cr-Release-Test / Makrotest	
	d) ^{51}Cr-Release-Test / Mikrotest	11
	e) Ablesen, % Zytotoxizität	12
	11. Kurzzeittest	13

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523702_0046

III. ERGEBNISSE

A) ERGEBNISSE ZUM TESTSYSTEM

A1) Optimum der zytotoxischen Aktivität von immunen Milzzellen 15

A2) Kurzzeittest

1. Inaktivierungskinetik 17
2. Wirkung des Temperatursprungs auf Tumorzellen 20
3. Zytotoxischer Effekt in 1', 10', 20', 30' 22

B) ERGEBNISSE MIT ANTISEREN UND ANTIKÖRPERN 23

B1) Wirkung von Kaninchen-anti-Maus-IgG-Serum und Kaninchen-anti-Maus-IgG-IgG auf zytotoxische T Zellen 23

1. Kaninchen-anti-Maus-IgG-Serum 23
2. Kaninchen-anti-Maus-IgG-IgG und normales Kaninchen-IgG 25

B2) Wirkung von Kaninchen-anti-Maus-thymus-IgG auf die Zytotoxizität von immunen Milzzellen 30

IV. DISKUSSION

1. Spezifität des T Zell-Rezeptors 33
2. Immunglobulin auf T Lymphozyten 35
3. Ist das Immunglobulin auf T Zellen der Rezeptor? 36

V. ZUSAMMENFASSUNG 42

VI. LITERATURVERZEICHNIS 43

A B K Ü R Z U N G E N

BSA	bovines Serumalbumin
CFA	Freund's complete adjuvant
FCS	fötales Kälberserum
GaRFc	Ziege-anti-Kaninchen-Fc Antikörper
Ig	Immunglobulin
IMZ	immune Milzzellen
IMZ-10	IMZ am 10. Tag nach Immunisierung
KaMIgGIgG	Kaninchenimmunglobulin-anti-Mausimmunglobulin
KaMIgG-Serum	Kaninchenserum-anti-Mausimmunglobulin
KaMTIgG	Kaninchenimmunglobulin-anti-Maus-Thymuszellen
KaMT-Serum	entsprechendes Serum
LM	Lymphommedium
LMØ	Lymphommedium ohne FCS
MIgG	Mausimmunglobulin
MW	Mittelwert
NKIgG	normales Kaninchenimmunglobulin
NKS	normales Kaninchen Serum
NMZ	normale Milzzellen
PPN	Polypropylen
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
S.D.	Standardabweichung
S.E.	Standardfehler

I. E I N L E I T U N G

Die Immunantwort als adaptive Reaktion des Organismus läßt sich in einen afferenten Schenkel, auf dem die Erkennung des Antigens erfolgt,und einen efferenten Schenkel, auf dem die immunkompetenten Zellen ihre spezifische Funktion erfüllen, trennen.

Während die Funktion der für die humorale Abwehr verantwortlichen B Lymphozyten in Bezug auf Antikörpersynthese in einigen Punkten geklärt ist, ist die eigentliche Reaktionsweise der T Lymphozyten und ihre Funktion bei der zellulären Abwehr sehr kontrovers. Insbesondere ist die Natur der Antigen Rezeptoren auf T Lymphozyten weitgehend ungeklärt.

So schließen einige Forscher (18,76,49) aus der Schwierigkeit, T Zellen mit normalem anti-Immunglobulin-Antikörper anzufärben auf völlig andersartige Rezeptoren als bei B Zellen. Andere finden mit empfindlicheren Techniken Immunglobulin (Ig) oder Ig ähnliche Moleküle auf T Lymphozyten und billigen diesen Rezeptorfunktionen zu.

Für die Charakterisierung von Antigen Rezeptoren ist zu fordern, daß ein Rezeptor nicht nur topographisch nachgewiesen, sondern auch in seiner Funktion durch spezifische Antikörper zu blockieren sein sollte.

Die für funktionelle Untersuchungen zur Verfügung stehenden Testsysteme der zellulären Immunität wie gemischte Lymphozytenkultur (MLC), Graft-versus-Host-Reaktion (GvH-Reaktion) und lymphozytenabhängige Zytolyse haben den Nachteil, daß sie längere Zeit (mehrere Stunden bis Tage) in Anspruch nehmen ,und so eine eventuelle Rezeptorblockade durch anti-Rezeptor Antikörper

durch schon in kurzer Zeit auftretende Capping- und Shedding-Effekte sowie Rezeptorneusynthese maskiert werden kann.

1974 konnten WAGNER und RÖLLINGHOFF (77) zeigen, daß in der zytotoxen Effektorphase für eine Aggressorzelle 5 - 10 Minuten Kontakt mit einer Zielzelle ausreichen, um sie zu erkennen und so zu verändern, daß sie in einer von Effektorzellen unabhängigen Phase lysiert.

Es wurde deshalb versucht, ein Kurzzeitsystem für einen zytotoxischen Test zu entwickeln, in dem Capping, Shedding und Resynthese von Rezeptoren ausgeschlossen sind, und in diesem System verschiedene anti-Maus-IgG-Antikörper und anti-Maus-Thymuszellen-Antikörper hinsichtlich einer möglichen Rezeptorblockade zu untersuchen.

II. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

1. Tumor

a) Herkunft

Das methyl-cholanthren-induzierte Mastozytom P 815-X 2 (20) (DUNN, POTTER) mit dem Histokompatibilitätsantigen H-2d wurde von Dr. H. Wagner, Mainz, zur Verfügung gestellt. Die bei - 70°C gelagerten Zellen wurden nach mehreren Passagen durch DBA Mäuse (H-2d) kontinuierlich alle 6 Tage transplantiert.

b) Transplantation

Jeweils am sechsten Tag nach Transplantation wurden die Mäuse in Äthernarkose getötet. Die im Aszites in monozellulärer Suspension gewachsenen Tumorzellen wurden mit 5 - 6 ml heparinisiertem Lymphommedium ohne fötales Kalbserum (FCS) (500 µl Liquemin 5000 ≙ 2500 I.E.Heparin + 5 - 6 ml Medium) in der Bauchhöhle aufgespült und abgesaugt, 10' bei 150 g zentrifugiert, 2 mal mit Lymphommedium ohne FCS (LMØ) gewaschen und auf eine Konzentration von 1 x 10^8 Zellen/ml adjustiert.
100 µl (≙1 x 10^7 Zellen) dieser Suspension wurden ip. auf DBA Mäuse transplantiert.

2. Tiere

Zwei verschiedene Inzucht-Mausstämme wurden als Versuchstiere verwendet:

1. C57/Bl/6J/BOM mit dem Histokompatibilitätsantigen H-2b, 8 - 10 Wochen alt,

2. DBA/2J/BOM mit dem Histokompatibilitäsantigen H-2d, 8 - 12 Wochen alt.
Beide Stämme wurden zum Teil an der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen durch Bruder-Schwester-Paarung gezüchtet (Eltern von Bomholtgard), zum Teil von Bomholtgard, Ry, Dänemark bezogen.

Als Serumspender dienten 4 - 6 kg schwere Kaninchen eines Wildstamms aus einheimischer Zucht.
Der Albinostamm A/NMRI (Naval Medical Research Institut) diente als Serumspender für die Maus IgG Präparation.

3. Medien

Lymphommedium (LMØ) wurde nach persönlicher Mitteilung von Frau Dr. Lohmann-Matthes, (MPI f. Immunbiol. Freiburg) angefertigt. 10 l Medium enthalten:
L-Cystin 0,480 g, L-Tyr. 0,720 g, $NaHCO_3$ 37,0 g, NaCl 64,0 g, KCl 4,0 g, $CaCl_2$ 2,0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2,0 g, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 1,25 g, Inositol 0,070 g, Dextrose Ø H_2O 45,0 g, L-Glutamin 5,82 g, Na-Pyruvat 1,10 g, Phenolrot 0,150 g, L-Asparagin 0,360 g, Folsäure 0,060 g, Aqua bidest.ad 10 l.

Fötales Kalbserum (FCS): Zur Milzzellpräparation und für ^{51}Cr-Release-Tests wurde LMØ mit 20 % FCS (=LM) verwendet (Gibco, Charge K 945301 und K 741 501).
Vor Gebrauch wurde das Serum jeweils 50' bei 56°C inaktiviert und 10' bei 1200 g zentrifugiert oder sterilfiltriert.

4. Herstellung von Kaninchen-anti-Maus-IgG-Serum

a) Maus-IgG Präparation

Die Maus-IgG Präparation erfolgte durch Amonsulfatfällung nach KENDALL (31) und Zonenelektrophorese in der Modifikation von EDELMANN (33).

a_a) Amonsulfatfällung: 50 ml Serum wurden im Eisbad langsam unter Rühren mit 50 ml Amonsulfatlösung (20g $(NH_4)_2SO_4$ in 50 ml) versetzt, was eine Endsättigung von 33 % ergab.
Die ausgefallenen Globuline wurden bei 2 000 g zentrifugiert, 2 mal mit 50 % gesättigter $(NH_4)_2SO_4$-Lösung gewaschen, in 5 ml Barbitalpuffer aufgelöst und dann für 30 h gegen Barbitalpuffer (Barbital-Natrium-HCl, pH 8,6) dialysiert.

a_b) Pevikon-Block-Elektrophorese: Auf einer 18 x 48 cm großen, 1 cm tiefen Platte, in die ca. 1 200 g äquilibriertes Pevikon (Pevikon C 870, Serva Heidelberg) gegossen war wurden 13 cm vom schmalen Rand entfernt in eine Rinne die in Barbitalpuffer gelösten Globuline aufgetragen.
Nach 30 h (300 V, 40 mA) Laufzeit wurde der Block in 2 cm breite Fraktionen aufgeteilt, Globuline und Proteinkonzentrationen darin bestimmt, und gepoolte Fraktionen gegen phosphatgepufferte NaCl-Lösung (PBS) Ø Acid dialysiert.

3 Pools (1 = 12 - 22 cm, IgG; 2 = 24 - 26 cm, IgG; 3 = 28 - 40 cm, Restproteine) wurden anschliesend lyophilisiert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

b) Immunisierung von Kaninchen

2 mg Maus IgG (MIgG) in 1 ml PBS gelöst wurden mit 1 ml Freund's complete adjuvant (CFA) gut vermischt und subkutan in die 4 Läufe eines Kaninchens injiziert. Nach 4 Wochen erfolgte eine Boosterinjektion von 1 mg MIgG.

c) Gewinnung von Kaninchen-anti-Maus-IgG-Serum

8 Tage nach der Boosterinjektion wurden den Kaninchen aus der Ohrarterie je 80 ml Blut entnommen. Es wurde 1 h bei 20°C, dann über Nacht bei 4°C stehen gelassen und am anderen Morgen bei 1 200 g zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde abgenommen, nochmals zentrifugiert und zur Komplementinaktivierung für 50' bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Dann erfolgte eine zweimalige Absorption mit Mauserythrozyten.
Alle Seren hatten einen passiven Hämagglutinationstitter von $1 : 2^{17} - 1 : 2^{18}$.

5. Präparation der Immunglobulin-Fraktion

a) Immunoadsorbens

Normales Kaninchen IgG (NKIgG) und Kaninchen-anti-Maus-IgG-IgG (KaMIgGIgG) wurden aus Serum über eine Ziege-anti-Kaninchen-Fc Säule (GaRFc) getrennt.

Die Säule war nach PORATH und AXEN (49) mit CNBr-aktivierter Sepharose 4 B (Pharmacia, Schweden) und DEAE gereinigtem GaRFc hergestellt und von Dr. R.P.Linke freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
Auf 2 10 ml-Säulen wurden jeweils 2,5 ml Serum gegeben, mit 100 ml PBS nachgespült und mit 0,5 m CH_3COOH eluiert. So präpariertes IgG wurde bei 4°C gegen 10 l PBS Ø Acid kontinuierlich dialysiert und dann in einer Konzentration von 10 mg/ml in 0,2 ml-Portionen bei -20°C aufbewahrt.

b) Ionenaustauschchromatographie

Ein Teil der benützten KaMIgGIgG-Präparationen wurde freundlicherweise von Dr. P.Rieber überlassen. Diese waren

mit 33 % gesättigter Amonsulfatlösung gefällt und anschließend über DEAE-Zellulose gereinigt (21).

6. Kaninchen-anti-Mausthymus IgG (KaMT IgG)

Die ebenfalls von Dr. Rieber zur Verfügung gestellten KaMT IgG-Präparationen waren wie folgt präpariert: Kaninchen waren mit NMRI-Thymuszellen nach NAGAYA und SIEKER (44) immunisiert worden und das gewonnene KaMT-Serum inaktiviert und 2 mal mit NMRI-Erythrozyten absorbiert. Die IgG-Fraktion war mit Amonsulfat gefällt und nach HEIDE und HAUPT (27) von den mitgefällten Albuminen getrennt.

Im zytotoxischen Test nach BOYSE, OLD und CHOUROULINKOV (12) ergab das IgG mit Komplement bis zu einer Verdünnung von 0,25 mg/ml 88 % tote Zellen, bei 0,125 mg/ml noch 36 % tote Zellen.

Der Lymphagglutinationstitter nach AMOS und PEACOCKE (5) betrug beim KaMT IgG 1 : 160 - 1 : 640.

Außerdem war das KaMT IgG mit Hilfe der Fluoreszenztechnik nach MÖLLER (43) hinsichtlich seiner Bindung an Milz-, Thymus- und Lymphknotenzellen charakterisiert. (80 % der Zellen zeigten Ringreaktion (56)).

Alle IgG-Lösungen wurden nach dem Auftauen 10' bei 1 200 g zentrifugiert und anschließend die Proteinkonzentration bestimmt.

7. Proteinbestimmung

Nach der von SCHACTERLE und POLLOCK (67) modifizierten Methode von LOWRY (38) wurde zu 1,0 ml der Proteinlösung unbekannter Konzentration (50 - 320 µg/ml) 1,0 ml alkalisches Cu Reagenz zugegeben und 10' bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurden 4,0 ml Phenolreagenz zugegeben, gemischt, und für 5' im 56°C Wasserbad inkubiert, anschließend sofort eine Minute lang unter kaltem Wasserstrahl gekühlt und bei 650 nm die Extinktion gegen Kontrolle ohne Protein gemessen.

Für jede Messung wurde eine neue Standartkurve mit Proteinkonzentrationen von 200 µg/ml, 100 µg/ml und 50 µg/ml mitbestimmt. (Stammlösung: 1 mg Bovines Serumalbumin (BSA) /ml).

Alkalisches Cu Reagenz besteht aus 0,5 n Na OH mit 10 % Na_2CO_3, 0,1 % KH-Tartrat und 0,05 % $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$.

Phenolreagenz: Mit H_2O auf 1 n verdünntes 2 n Folinreagenz wurd mit H_2O im Verhältnis 1 : 9 gemischt.

8. Immunelektrophorese

Die präzipitierten IgG Fraktionen wurden teilweise mit der Immunelektrophorese nach SCHEIDEGGER (68) charakterisiert.

9. Reagenzgefäße

Alle Zellen wurden in sterilen 10 ml Röhrchen aus Polypropylen (PPN) (Falcon, Catonville M.D., Kat.Nr. 2006) präpariert und aufbewahrt, zytotoxische Tests in 5 ml

Reagenzröhrchen aus PPN (Greiner, Nürtingen; Kat. Nr. 2175) und 1,5 ml Analysengefäßen aus PPN (Greiner, Kat. Nr. 291) mit rundem Boden durchgeführt.

10. Testsystem

a) Milzzellpräparation

4 - 15 Tage nach ip. Injektion von 2 - 2,5 x 10^7 P 815 Zellen (H-2d) in 8 - 10 Wochen alte C 57/Bl Mäuse (H-2b) wurden deren Milzen entnommen und mit 15 ml Tenbroeck Tissue Grinders (Kat.Nr. 1982, Bellco Biological Glasware and Equipment, Vineland, N.Y.) in 10 ml LM durch 3 - 5 maliges Zerquetschen zerkleinert.

Die so erhaltene Suspension wurde 10' bei 150 g zentrifugiert, das Sediment in 2 ml LM aufgenommen und durch ein feines Stahlnetz (Maschenweite 50μ , Fa. Weisse u. Esschrich, Ludwigstadt/ Bayern) gegeben.

Die nun erhaltene monozelluläre Suspension wurde nochmals in 10 ml LM gewaschen, 10' bei 150 g zentrifugiert und mit einer Endkonzentration von 1 x 10^7 Zellen/ml in LM suspendiert.

Milzzellen aus normalen (nicht immunisierten) Mäusen (NMZ) wurden entsprechend präpariert.

Während der Präparation wurden die Zellen im Eisbad bzw. bei +4°C gehalten.

In allen Zellpräparationen waren weniger als 5 % tote Zellen (mit Trypanblau angefärbt).

b) Tumorzellpräparation

P 815 Mastozytom-Zellen wurden am 6. Tag nach ip. Transplantation von 1 x 10^7 Zellen aus DBA Mäusen gewonnen. Im Durchschnitt erbrachte eine Maus 2 - 3 x 10^8 Zellen.

Der Tumor wurde mit heparinisiertem LM wie unter 'Transplantation' beschrieben aus der Bauchhöhle aufgesogen, nach Zentrifugation (10', 150 g) jedoch nochmals mit heparinisiertem LM (2 500 IE Heparin/12ml Medium) gewaschen, anschließend 2 mal mit LM ohne Heparin.

c) ^{51}Cr-Release-Test -Makrotest (Inkubationvol. 1 ml)

c_a) Markierung: Nach einer Modifikation des von BRUNNER et al. (13) beschriebenen zytotoxischen Tests (^{51}Cr-Release-Test) wurden 5 x 10^6 Tumorzellen in 0,5 ml Medium mit 100 µl (100 µCi) ^{51}Cr in 1,5 ml Reaktionsgefäßen eine halbe Stunde lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert. (Natrium-Chromat -^{51}Cr- Injektionslösung, steril in isoton. Nacl, Akt. Konz. 1 mCi/ml, spez. Akt. 50 - 150 mCi/mg Cr, Best. Nr. CJS 1 P, Amersham Buchler, Frankfurt.)

Anschließend wurde 10' bei 150 g zentrifugiert, der Überstand mit ausgezogenen Pasteurpipetten abgehebert und das Sediment 3 mal in 1 ml LM gewaschen und abzentrifugiert.

Die chromierten Zellen wurden auf eine Konzentration von 1 x 10^5 Zellen / ml adjustiert.

c_b) Testansatz: Sofern nicht anders vermerkt, wurden 500 µl der Suspension immuner Milzzellen (IMZ), ≙ 5 x 10^6 Zellen, und 500 µl Tumorzellsuspension, ≙ 5 x 10^4 Zellen

in 5 ml PPN-Reagenzröhrchen zusammenpipettiert und entweder sofort 3 - 24 h bei 37°C im feuchten, begasten Brutschrank (5 l Luft/min, 10 % CO_2) inkubiert, oder 2' bei 400 g anzentrifugiert (WAGNER (4)) und dann im Brutschrank inkubiert.

Kontrollen: 500 µl Tumorzellen + 500 µl NMZ
500 µl Tumorzellen + 500 µl Medium

d) ^{51}Cr-Release-Test - Mikrotest (Inkubationsvol. µ200 l)

Ein Mikrotestsystem wurde entwickelt, da

1. der Makrotest bei Vierfachwerten nur 10 verschiedene Testansätze mit Zellen einer Maus zuläßt (Testansatz 5 x 10^6MZ, Gesamtzellzahl aus einer Milz 2 x 10^8 Zellen)

2. bei anderen Aktivierungsmodi (MLC, in vivo aktivierte T Zellen) noch weniger Aggressorzellen als aus einer Mausmilz zur Verfügung stehen,

3. Seren und Antikörper, deren Einfluß auf die zytotoxische Aktivität von Zellen untersucht werden sollten, oft nur in geringen Mengen zur Verfügung stehen oder hergestellt werden können.

d_a) Markierung: Um hochmarkierte Tumorzellen zu erhalten, wurden 2 x 10^6 Tumorzellen in 200 µl LM mit 300 µl ^{51}Cr (300 Ci) in 1,5 ml Analysengefäßen 1,5 h bei 37°C im Wasserbad mit gelegentlichem Aufschütteln inkubiert. Anschließendes Waschen und Einstellen der Zellkonzentration entsprechend c_a).

d_b) Testansatz: Für Kurzzeitversuche und Inaktivierungskinetik wurden je 100 µl IMZ (NMZ, Medium) ≙ 1 x 10^6 Zellen und 100 µl Tumorzellen ≙ 1 x 10^4 Zellen in 1,5 ml Analysengefäßen zusammenpipettiert, 45'' bei 400 g anzentrifugiert und anschließend inkubiert.

Für Versuche mit Seren und Ig-Präparationen wurden die Zellsuspensionen auf doppelte Konzentration eingestellt (Aggressorzellen 2 x 10^7/ ml, Zielzellen 2 x 10^5/ml) und jeweils 50 µl Aggressorzellen + 50 µl Zielzellen zu 100 µl Medium, Serum- oder Ig-Verdünnung zupipettiert. Anschließendes Zentrifugieren und Inkubation wie oben.
Alle Versuche wurden mit Doppel- oder Vierfachwerten ausgeführt.

e) Ablesen, % Zytotoxizität

Nach definierter Inkubationszeit wurden die Röhrchen 6 mal gekippt, 5' bei 400 g zentrifugiert und anschließend der halbe Überstand abpipettiert (Makrotest 500 µl, Mikrotest 100 µl).

Die Aktivität im Sediment + 1/2 Überstand und in 1/2 Überstand wurden 1' in einem γ-Counter (Nuclear Chicago) gezählt.

% Zytotoxizität wurde berechnet als:

$$\frac{\text{in den Überstand freigesetztes } {}^{51}Cr \text{ in Anwesenheit von Aggressorzellen}}{\text{insgesamt eingebautes } {}^{51}Cr} \times 100$$

% spezifische Zytotoxizität als:

$$\frac{\% \text{ Zytotoxizität} - \% \text{ Spontanrelease}}{\% \text{ Maximalrelease} - \% \text{ Spontanrelease}} \times 100$$

Spontanrelease = % freigesetztes ^{51}Cr in Kontrollansätzen aus NMZ bzw. Medium und markierten Tumorzellen.

Bei beiden Markierungsarten betrug der Spontanrelease unmittelbar nach der Markierung jeweils 0,5 - 1 % und stieg linear mit der Zeit bis auf 10 - 12 % nach 4 h Inkubation an.

Maximalrelease = % freigesetztes ^{51}Cr im Überstand von Testansätzen, entsprechend denen für Spontanrelease, die 4 mal auf -70°C eingefroren und dazwischen aufgetaut und auf +20°C erwärmt wurden.

Der Maximalrelease betrug bei allen Versuchen 85 - 95 % des inkorporierten ^{51}Cr.

11. Kurzzeittest

In Anlehnung an WAGNER (78) und MILLER (41) wurde ein Kurzzeittest entwickelt, in dem Aggressorzellen nach einer bestimmten Zeit der Interaktion mit Tumorzellen selektiv inaktiviert werden.

Tumorzellen und Aggressorzellen wurden wie oben beschrieben

zusammenpipettiert, anzentrifugiert und eine definierte Zeit lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert.
Nach der gewünschten Interaktionszeit (1' - 30') wurden die Röhrchen sofort 10' lang im 44°C warmen Wasserbad inkubiert.

Nach weiteren 4 Stunden (Lyse) im feuchten, begasten Brutschrank wurden die Zellen abzentrifugiert und abgelesen.

III. ERGEBNISSE

A) ERGEBNISSE ZUM TESTSYSTEM

A1) Optimum der zytotoxischen Aktivität von immunen Milzzellen

Jeweils 4 C 57/Bl Mäuse wurden an aufeinanderfolgenden Tagen mit 2,5 x 10^7 P 815 Zellen ip. immunisiert. Nach 3 - 21 Tagen wurden die Milzen entnommen. Dabei war makroskopisch eine Vergrößerung der Milz ab dem 7. Tag nach der Immunisierung zu erkennen; Tumorzellen waren ip. bis zum 9. Tag nach Injektion nachzuweisen.

Die Milzzellen wurden im Makrotest 4 Stunden und 12 Stunden lang im Verhältnis 100 : 1 mit Tumorzellen inkubiert. Dabei zeigte sich ein schwacher zytotoxischer Effekt ab dem 5. Tag nach Immunisierung, am 8. - 10. Tag ein steiler Anstieg mit der höchsten Aktivität am 10. Tag und ein anschließender Abfall bis auf weniger als die Hälfte am 20. Tag (FIG. 1).

In den folgenden Versuchen wurden daraufhin immune Milzzellen jeweils am 10. Tag nach der Immunisierung verwendet (IMZ-10).

A2) Kurzzeittest

Für Untersuchungen über die Natur des T Zell-Rezeptors ist es von Interesse, ein Testsystem mit möglichst kurzer Interaktionszeit zwischen Aggressor- und Zielzellen zu

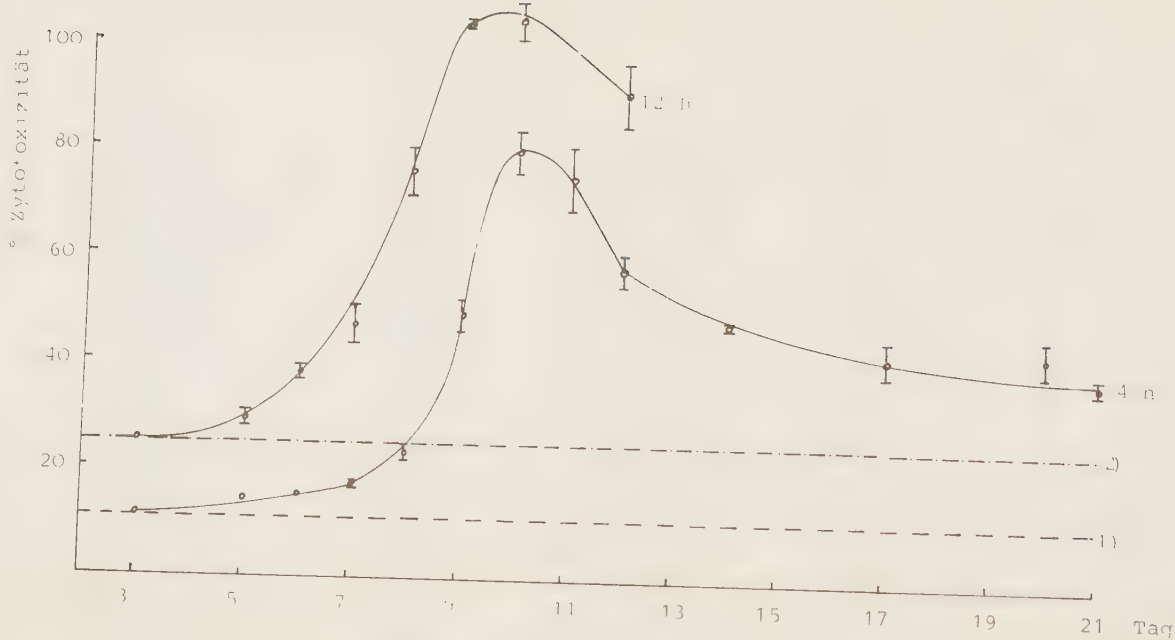

FIG. 1: Zytotoxizität in Abhängigkeit von der Zeit nach Immunisierung.

Mittelwerte aus je 4 Mäusen ± S.E.
1) Spontanrelease in 4 h
2) Spontanrelease in 12 h

verwenden, damit eine etwaige von anti-Rezeptor-Antikörpern bewirkte Inhibition nicht durch Capping- oder Shedding-Effekte maskiert wird.
MILLER und DUNKLEY (42) konnten zeigen, daß in vivo aktivierte T Zellen nach einer einstündigen Inkubation bei 45°C keine zytotoxische Aktivität mehr besitzen. Es wurde daher die Möglichkeit einer selektiven Inaktivierung immuner Milzzellen durch einen Temperatursprung untersucht.

1. Inaktivierungskinetik

IMZ-10 wurden 1' - 15' im 44°C warmen Wasserbad inkubiert, anschließend mit markierten Tumorzellen gemischt, anzentrifugiert und 4 Stunden bzw. 12 Stunden im begasten, 37°C warmen Brutschrank inkubiert.

Mikro- und Makrotest zeigten hierbei übereinstimmende Ergebnisse: nach 2' geringe oder keine Minderung der zytotoxischen Aktivität, nach 5' zwischen 11 % und 18 % weniger Zytotoxizität und zwischen 5' und 10' einen steilen Abfall. Bei 10' 44°C-Inkubation von IMZ vor Zugabe von Tumorzellen entsprachen die Werte jeweils dem Spontanrelease.

Die Ergebnisse eines typischen Experiments werden in FIG. 2 gezeigt.

Auch nach längerer Inkubationszeit mit Tumorzellen erreichen 44°C - inaktivierte IMZ ihre zytotoxische Aktivität nicht wieder (FIG. 3).

Die Trypanblaufärbung der wärmebehandelten IMZ zeigte keinen Unterschied zu nichterwärmten.

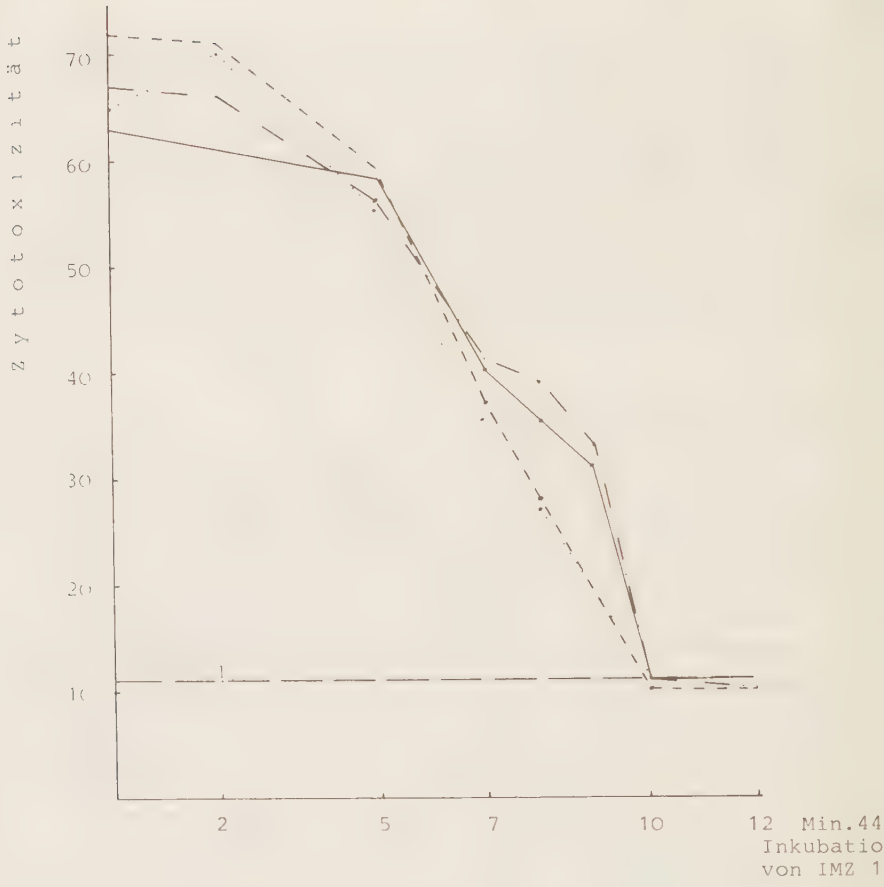

FIG. 2: Inaktivierungskinetik von IMZ bei 44°C.

IMZ von 4 Mäusen wurden 2 - 12 Minuten lang im 44°C warmen Wasserbad gehalten, anschließend mit markierten Tumorzellen gemischt, 45" bei 150 g anzentrifugiert und bei 37°C 4 Stunden lang inkubiert.

1) Spontanrelease

--- IMZ 1
····· IMZ 2
— · — IMZ 3
——— IMZ 4

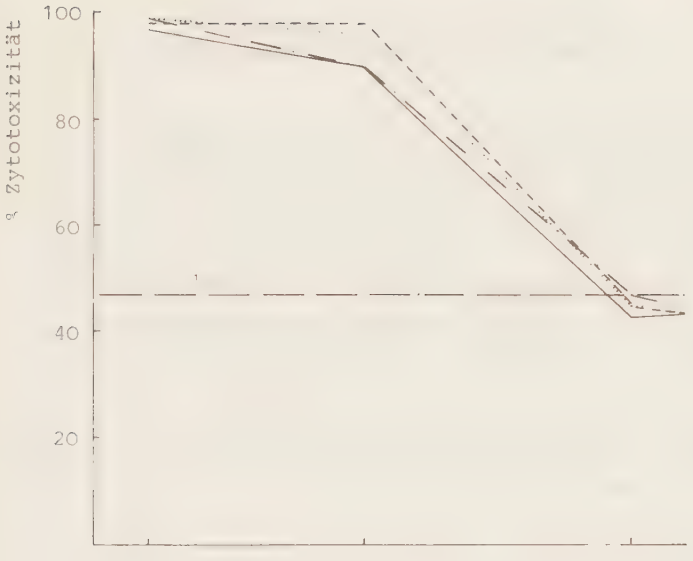

FIG. 3: Hitzeinaktivierte IMZ nach 15 h 37°C Inkubation.

IMZ von vier Mäusen wurden 1', 5', 10' und 11' im 44°C warmen Wasserbad gehalten, dann mit Tumorzellen gemischt, 45" bei 150 g anzentrifugiert und 15 h lang im 37°C Brutschrank inkubiert. Die 10' lang hitzeinaktivierten IMZ haben ihre Zytotoxizität nicht wiedererlangt.

1) Spontanrelease nach 15 h

--- IMZ 1
..... IMZ 2
—·— IMZ 3
——— IMZ 4

2. Wirkung des Temperatursprungs auf Tumorzellen

Um die Wirkung des Temperatursprungs auf Mastozytomzellen zu untersuchen (evtl. erhöhter Spontanrelease, veränderte Suszeptibilität für Aggressorzellen) wurden 1×10^4 (5×10^4) markierte Mastozytomzellen in 100 l (500 l) Volumen 10' bei $44^{\circ}C$ inkubiert, anschließend mit 1×10^6 (5×10^6) IMZ gemischt, anzentrifugiert, und 4 Stunden lang bei $37^{\circ}C$ im begasten Brutschrank gelassen. Als Kontrolle dienten P 815 Zellen ohne Temperatursprung + IMZ.

Nach 4 Stunden Inkubationszeit war der Prozentsatz freigesetzten Chroms in beiden Ansätzen gleich groß (FIG. 4a), der Spontanrelease betrug jeweils 10 %.

Auch nach 15 Stunden Inkubationszeit zeigten die wärmebehandelten Tumorzellen gleiches Verhalten wie nicht-erwärmte (FIG. 4b).

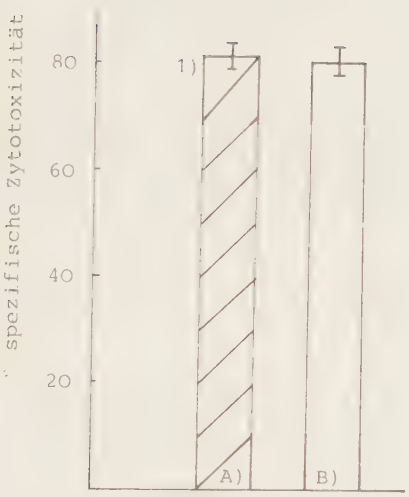

FIG. 4a) Wirkung des Temperatursprungs auf Mastozytomzellen nach 4 h 37°C Inkub.

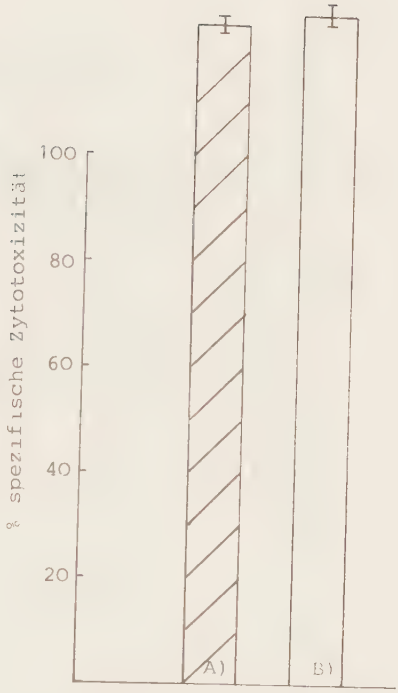

FIG. 4b) Testansätze wie bei FIG. 4a), jedoch 15 h 37°C.

A) P 815 Zellen wurden 10' lang bei 44°C inkubiert, dann mit IMZ gemischt, 45" bei 150 g anzentrifugiert und 5 h bei 37°C inkubiert.

B) P 815 Zellen wurden mit IMZ gemischt, 45" bei 150 g anzentrifugiert und ohne Temperatursprung 5 h bie 37°C inkubiert.

1) Mittelwerte ± S.E. aus 2 Versuchen mit fe 4 Mäusen

3. Zytotoxischer Effekt in 1', 10', 20', 30'

Da es bei Versuchen mit Antiseren und Antikörpern von Interesse war, eine möglichst kurze Interaktionszeit zwischen Aggressor- und Zielzellen zu erreichen, andrerseits aber zur Beurteilung einer Hemmung der zytotoxische Effekt groß genug sein muß, wurde die Korrelation zwischen % ^{51}Cr-Release und Zeitdauer der Interaktion vor Temperatursprung untersucht. Bei einem Verhältnis Aggressor- zu Zielzellen von 100 : 1 betrug der zytotoxische Effekt nach 30' 37°C-Inkubation, anschließender Inaktivierung und 4 Stunden Lyse im Durchschnitt zwischen 25 % und 60 % (FIG. 5).

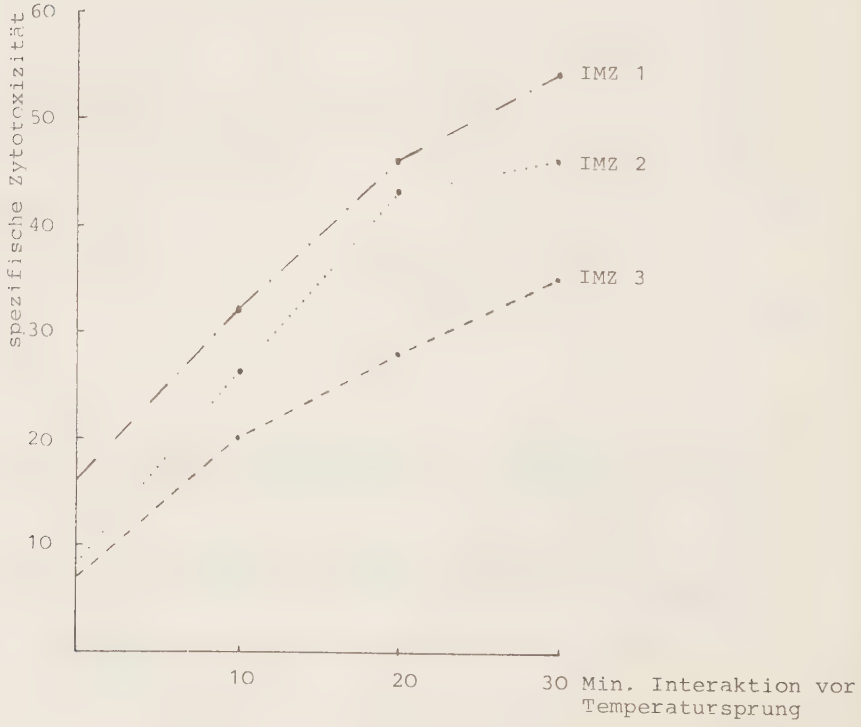

FIG. 5: Zytotoxischer Effekt in Abhängigkeit von der Zeit der Interaktion.

IMZ von 3 Mäusen + P 815 Zellen wurden bei 37°C inkubiert und 10', 20', 30' und sofort nach Zusammenpipettieren 10' bei 44°C gehalten, anschließend 4 h Lyse bei 37°C.

B) ERGEBNISSE MIT ANTISEREN UND ANTIKÖRPERN

B1) Wirkung von Kaninchen-anti-Maus-IgG-Serum und Kaninchen-anti-MausIgG IgG auf zytotoxische T Zellen

Oberflächen Ig wurde von mehreren Autoren (15, 22, 39, 57, 58) auf T Zellen nachgewiesen und mit einem T Zell-Rezeptor in Verbindung gebracht (25). Es wurden daher mit KaMIgG-Serum und KaMIgGIgG Hemmversuche gemacht.

1. Kaninchen-anti-Maus-IgG-Serum

Hemmversuche mit KaMIgG-Serum wurden im Mikrosystem als Kurzzeittests (30' Interaktion) durchgeführt.
Die Serumendverdünnungen waren 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1 000 und 1 : 10 000. Als Kontrollen dienten Ansätze mit normalem Kaninchenserum (NKS) und ohne Kaninchenserum.

Wie aus TABELLE 1 hervorgeht, bewirkte keines der untersuchten KaMIgG-Seren einen signifikanten Abfall der Zytotoxizität unter die Mediumkontrolle. Teilweise erhöhte Werte korrelieren mit der Gesamtserumkonzentration in den Ansätzen, sind jedoch nicht auf spezifische KaMIgG-Effekte zurückzuführen, da zwischen KaMIgG-Serum und NKS-Kontrollen kein signifikanter Unterschied besteht.

	NKS 1	KaMIgG-Serum 1	NKS 2	KaMIgG-Serum 2	NKS 3	KaMIgG-Serum 3
Exp. Nr.	1		2		3	
Mediumkontrolle	24 ± 4,91[1] (± 12,04)		14 ± 2,83 (± 6,34)		77 ± 11,22 (± 27,50)	
1 : 10	27 ± 4,89 (± 11,97)	26 ± 4,57 (± 11,21)	27 ± 4,73 (± 11,60)	24 ± 4,25 (± 10,40)	80 ± 9,58 (± 23,46)	88 ± 8,36 (± 20,50)
1 : 100	22 ± 4,75 (± 11,65)	19 ± 4,04 (± 9,91)	21 ± 4,78 (± 11,72)	21 ± 4,61 (± 11,30)	--	73 ± 12,02 (± 29,46)
1 : 1 000	21 ± 5,30 (± 13,00)	21 ± 3,58 (± 8,77)	17 ± 2,90 (± 7,12)	21 ± 4,88 (± 11,96)	74 ± 8,80 (± 21,56)	78 ± 11,30 (± 27,68)
1 :10 000	18 ± 3,34 (± 8,18)	19 ± 5,41 (± 13,25)	18 ± 5,07 (± 12,42)	19 ± 4,73 (± 11,58)	--	79 ± 10,44 (± 25,58)

TABELLE 1 : Wirkung von KaMIgG-Serum und NKS auf die Zytotoxizität von IMZ.
Exp.1 und 2 : 30' Interaktion, Exp. 3: 4 h Interaktion
1) % spezifische Zytotoxizität, MW aus 3 Mäusen ± S.E. (S.D.)

2. Kaninchen-anti-Maus-IgG IgG und normales Kaninchen-IgG

Als Vergleich zu Versuchen mit KaMIgGIgG wurde die Wirkung von NKIgG auf die Zytotoxizität von IMZ untersucht. Die Endkonzentrationen waren 1,0, 0,1, 0,01, 0,001 mg Protein/ml. Wie TABELLE 3 zeigt, schwanken in 4 von 6 Versuchen die Werte mit NKIgG geringfügig um die Mediumkontrolle (Versuch 3 - 6). NKIgG 1 ergab gegenüber der Kontrolle einmal um 8 % und einmal um 11 % gesteigerte Zytotoxizität.

KaMIgGIgG von 6 verschiedenen Kaninchen wurde in den gleichen Endkonzentrationen wie NKIgG im Kurzzeittest (30') hinsichtlich seiner Wirkung auf die Zytotoxizität von IMZ untersucht.

Wie aus TABELLE 2 ersichtlich, ergab keine der KaMIgGIgG-Präparationen eine signifikant unter der Mediumkontrolle liegende Inhibition der Zytotoxizität, es zeigte sich im Gegenteil in 9 von 13 Versuchen eine Steigerung bis zu + 34 %.

Im einzelnen zeigen 1) KaMIgGIgG 1 und 3 (Versuch 1, 2, 6) überhaupt keinen Effekt, ebenso KaMIgGIgG 6 in Versuch 13,

2) KaMIgGIgG 4 in Versuch 8 eine geringe und in Versuch 7 und 9 eine starke Steigerung des zytotoxischen Effekts (bis zu + 34 % gegen Mediumkontrolle) ebenso ergaben KaMIgGIgG 2, 5 und 6 (Versuch 3, 4, 5, 10, 11, 12) eine deutlich gesteigerte Zytotoxizität gegenüber den Kontrollen.

	KaMIgGIgG 1 (348) 1)		KaMIgGIgG 2 (362)			KaMIgGIgG 3 (363)
Experiment Nr.	1	2	3	4	5	6
Mediumkontrolle	2) 19 ± 3,27 (± 11,18)	26 ± 3,51 (± 8,65)	29 ± 4,80 (± 11,76)	19 ± 3,27 (± 11,18)	27 ± 1,50 (± 2,12)	26 ± 3,53 (± 8,65)
1,0 mg/ml	18 ± 3,20 (± 7,84)	26 ± 1,72 (± 4,22)	37 ± 7,60 (± 18,60)	22 ± 2,39 (± 5,85)	57 ± 1,0 (± 1,41)	30 ± 3,25 (± 7,96)
0,1 mg/ml	22 ± 3,29 (± 8,06)	26 ± 1,69 (± 4,14)	48 ± 5,77 (± 14,15)	24 ± 3,08 (± 7,55)	38 ± 1,41 (± 2,0)	24 ± 2,71 (± 6,63)
0,01 mg/ml	22 ± 2,84 (± 6,97)	23 ± 2,59 (± 6,34)	56 ± 4,25 (± 10,42)	23 ± 2,24 (± 5,49)	50 ± 3,50 (± 4,94)	23 ± 2,12 (± 5,20)
0,001 mg/ml	20 ± 2,42 (± 5,93)	22 ± 2,58 (± 6,32)	43 ± 8,61 (± 19,25)	26 ± 2,82 (± 6,91)	43 ± 3,5 (± 4,94)	24 ± 2,53 (± 6,22)

Experiment Nr.	KaMIgGIgG 4 (364)			KaMIgGIgG 5 (365)		KaMIgGIgG 6 (sp.Pool)	
	7	8	9	10	11	12	13
Mediumkontrolle	29 ± 4,80 (± 11,76)	19 ± 3,27 (± 11,18)	33 ± 1,82 (± 6,33)	14 ± 2,83 (± 6,34)	29 ± 4,80 (± 11,76)	50 ± 3,89 (± 9,52)	33 ± 1,82 (± 6,33)
1,0 mg/ml	32 ± 4,88 (± 11,97)	20 ± 2,44 (± 7,55)	42 ± 3,89 (± 9,53)	15 ± 2,94 (± 7,20)	28 ± 4,88 (± 11,95)	48 ± 3,43 (± 8,40)	37 ± 3,07 (± 7,52)
0,1 mg/ml	52 ± 8,35 (± 20,47)	24 ± 2,75 (± 6,75)	52 ± 3,38 (± 8,28)	19 ± 4,63 (± 11,34)	47 ± 6,31 (± 15,46)	61 ± 3,64 (± 8,93)	35 ± 4,70 (± 11,53)
0,01 mg/ml	58 ± 6,76 (± 16,58)	20 ± 3,42 (± 8,40)	32 ± 3,89 (± 9,54)	21 ± 4,98 (± 12,21)	46 ± 7,95 (± 19,48)	57 ± 3,68 (± 9,53)	32 ± 3,21 (± 7,86)
0,001 mg/ml	63 ± 6,83 (± 16,73)	20 ± 3,77 (± 9,23)	31 ± 4,04 (± 9,91)	19 ± 4,77 (± 18,68)	48 ± 6,74 (± 16,50)	58 ± 5,51 (± 13,50)	31 ± 2,23 (± 5,47)

TABELLE 2: Wirkung von KaMIgGIgG auf die Zytotoxizität von IMZ.

1) Kaninchen Nr. 2) % spezifische Zytotoxizität + S.E. (S.D.),ME aus je 3 Mäusen

FIG. 6 zeigt, daß das KaMIgGIgG auf die Zellen aller 3 Versuchstiere gleichsinnig wirkte. Gleichzeitig wird auch deutlich, daß die Versuchstiere einer Gruppe häufig verschieden starke Immunität erlangt hatten (daher oft hohe S.D.).

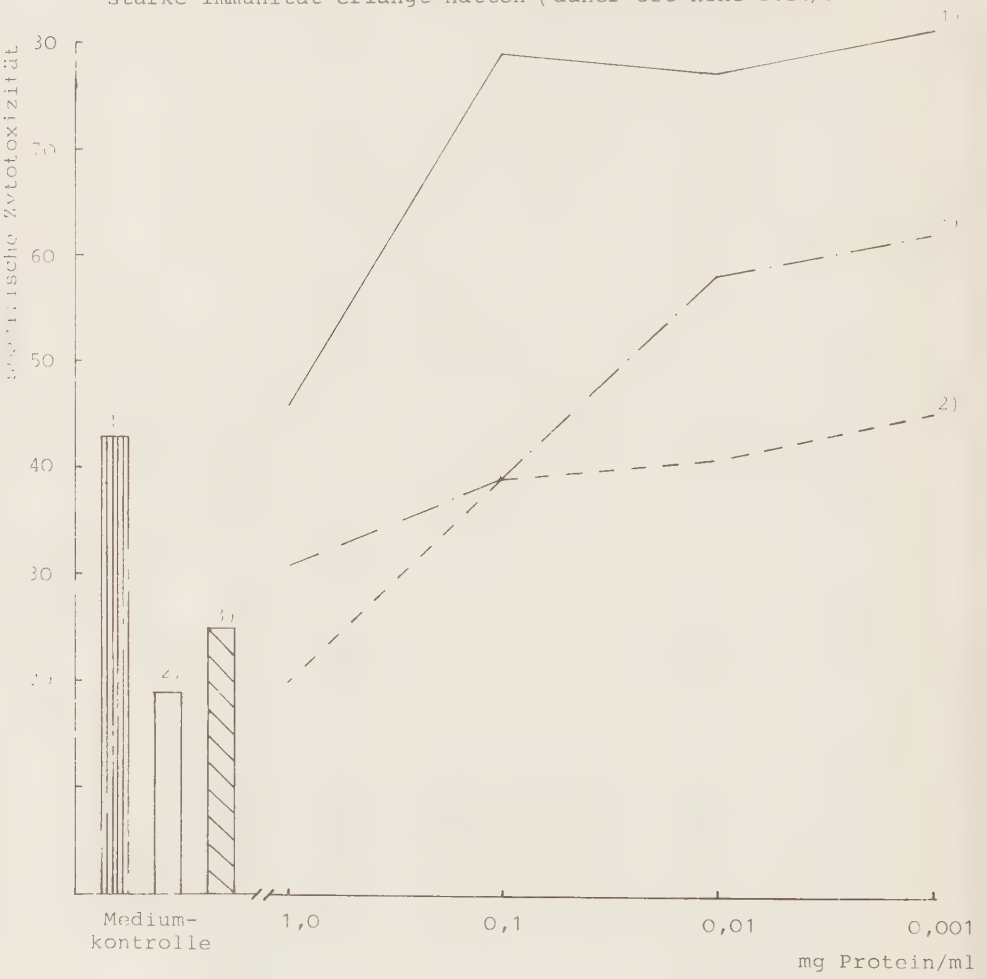

FIG. 6: Wirkung eines KaMIgGIgG auf die Zytotoxizität von IMZ.

(Exp. 7) Milzzellen von 3 immunen Mäusen wurden 30' mit P 815 Zellen und KaMIgGIgG bei 37°C inkubiert, dann 10' bei 44°C, anschließend 4 h bei 37°C.

1) IMZ 1
2) IMZ 2
3) IMZ 3

Exp. Nr	NKIgG 1		NKIgG 2		NKIgG 3	
	1	2	3	4	5	6
Mediumkontrolle	1) 19 ± 3,27 (± 11,18)	33 ± 1,82 (± 6,33)	50 ± 3,89 (± 9,52)	28 ± 2,24 (± 5,50)	33 ± 1,82 (± 6,33)	26 ± 3,53 (± 8,56)
1,0 mg/ml	27 ± 1,97 (± 4,84)	35 ± 4,77 (± 9,55)	45 ± 3,17 (± 7,78)	26 ± 2,94 (± 6,58)	--	24 ± 2,21 (± 5,41)
0,1 mg/ml	22 ± 3,07 (± 7,53)	40 ± 2,56 (± 6,28)	48 ± 4,13 (± 10,13)	31 ± 3,85 (± 9,43)	35 ± 4,30 (± 10,63)	26 ± 2,92 (± 7,15)
0,01 mg/ml	18 ± 2,21 (± 5,43)	37 ± 4,22 (± 10,34)	52 ± 4,53 (± 11,11)	30 ± 3,40 (± 8,34)	35 ± 5,04 (± 10,09)	27 ± 1,99 (± 4,88)
0,001 mg/ml	20 ± 1,89 (± 4,63)	44 ± 3,71 (± 9,10)	51 ± 2,58 (± 6,32)	30 ± 2,09 (± 5,12)	33 ± 3,67 (± 8,99)	27 ± 2,95 (± 7,23)

TABELLE 3: Wirkung von NKIgG auf die Zytotoxizität von IMZ.

Nach 30' 37°C Inkubation wurden die Ansätze 10' bie 44°C inkubiert, anschließend 4 h bei 37°C.

1) % spezifische Zytotoxizität ± S.E. (S.D.), MW aus je 3 Mäusen

B2) Wirkung von Kaninchen-anti-Mausthymus-IgG auf die Zytotoxizität von immunen Milzzellen

Daß der ^{51}Cr-Release-Test in seiner Kurzzeitmodifikation zur Untersuchung von Rezeptorstrukturen ein durchaus brauchbares System ist, zeigen Hemmversuche mit KaMTIgG.

Die Inhibition der Zytotoxizität -hier allerdings wohl nicht durch spezifische Rezeptorblockade- wurde im Kurzzeitsystem nicht durch Shedding- oder Capping-Effekte überlagert.

Drei verschiedene KaMTIgG-Präparationen wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die zytotoxische Aktivität immuner Milzzellen untersucht. Dabei war die Endkonzentration im Testansatz jeweils 1,0, 0,1, 0,01, 0,001 mg Protein/ml.

Wie aus TABELLE 4 hervorgeht, ergaben alle 3 Präparationen bei einer Konzentration von 1 mg/ml völlige Inhibition, 2 zeigten auch bei 0,1 mg/ml verringerte zytotoxische Aktivität von IMZ gegenüber Medium- und NKIgG-Kontrolle.

Alle Experimente wurden im Mikrosystem als Kurzzeittests (30') durchgeführt.
Konzentrationen von 0,01 mg/ml und 0,001 mg/ml ergaben in allen Versuchen zwischen 3 % und 29 % gesteigerten zytotoxischen Effekt.

FIG. 7 gibt ein typisches Experiment wieder.

	KaMTIgG 1		KaMTIgG 2		KaMTIgG 3	
Experiment Nr.	1	2	3	4	5	6
Mediumkontrolle	[1)] 17 ± 3,14 (± 7,0)	27 ± 3,16 (± 10,49)	51 ± 3,53 (± 11,71)	33 ± 2,25 (± 8,7)	51 ± 3,53 (± 11,71)	33 ± 2,25 (± 8,7)
1,0 mg/ml	3 ± 1,35 (± 3,31)	8 ± 2,25 (± 5,51)	0 ± 1,29 (± 3,16)	1 ± 0,66 (± 1,6)	4 ± 1,4 (± 3,6)	0 ± 0,93 (± 1,28)
0,1 mg/ml	22 + 3,86 (± 9,46)	35 ± 5,96 (± 14,6)	7 ± 0,87 (± 2,07)	5 ± 0,78 (± 1,19)	37 ± 2,77 (± 6,79)	12 ± 1,47 (± 3,61)
0,01 mg/ml	28 ± 4,46 (± 10,94)	56 ± 7,45 (± 18,27)	55 ± 2,60 (± 6,37)	29 ± 3,40 (± 8,33)	61 ± 3,25 (± 7,96)	36 ± 3,35 (± 7,50)
0,001 mg/ml	31 ± 7,89 (+ 19,3)	55 ± 6,74 (+ 16,52)	63 ± 4,90 (+ 12,0)	35 ± 4,39 (+ 10,75)	56 ± 6,11 (+ 14,97)	29 ± 2,61 (+ 6,41)

TABELLE 4: Wirkung von KaMTIgG auf die Zytotoxizität von IMZ.

1) % spezifische Zytotoxizität, MW aus drei Mäusen ± S.E. (S.D.)

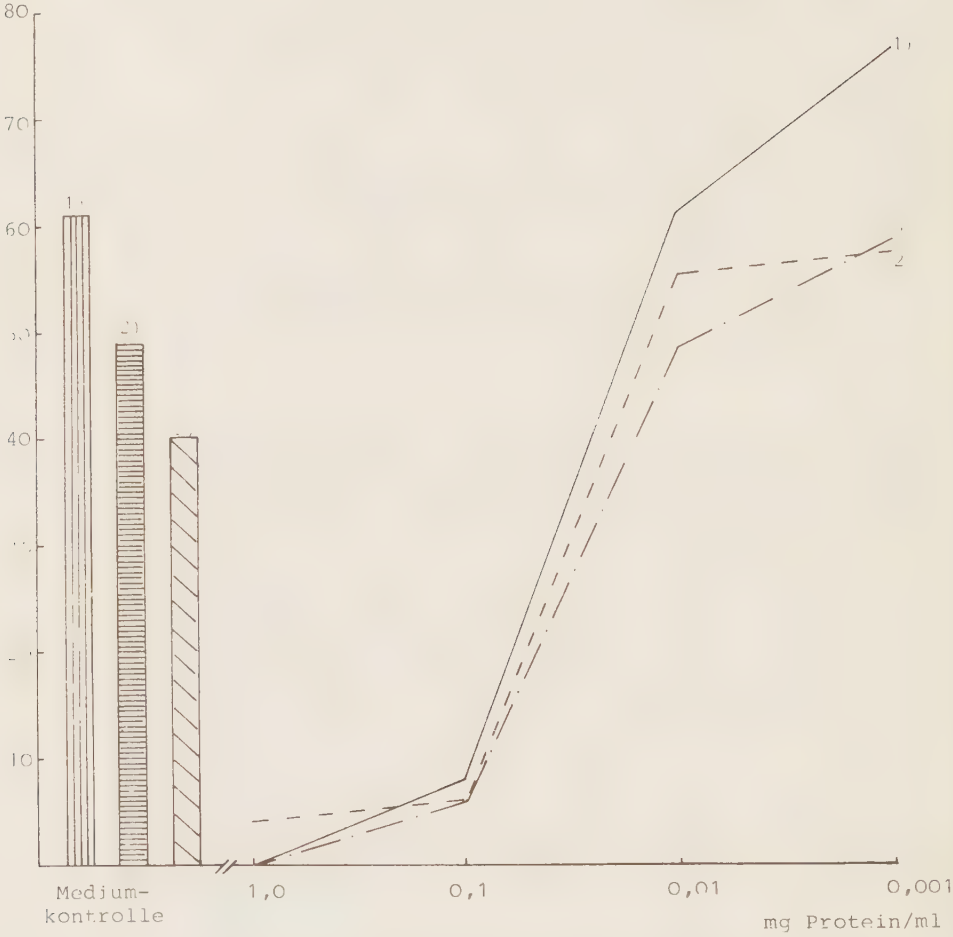

FIG. 7: Wirkung von KaMTIgG auf die Zytotoxizität von IMZ.

(Exp. 3) IMZ von 3 Mäusen wurden mit KaMTIgG und P 815 Zellen 30' bei 37°C inkubiert, dann 10' bei 44°C, anschließend 4 h bei 37°C

1) IMZ 1
2) IMZ 2
3) IMZ 3

IV. D I S K U S S I O N

Die immunkompetenten Zellen sind die Lymhpozyten (24). Diese werden übereinstimmend in zwei Hauptgruppen unterteilt: Die B Lymphozyten, -nach der Bursa Fabricii (oder Äquivalent) benannt, in der diese Zellen reifen,- für die humorale Abwehr verantwortlich, und die T Lymphozyten, -Thymus abhängige- die die Träger der zellulären Immunität sind. Beide Zellformen gehen nicht ineinander über (17).

Um ihre spezifische Funktion wahrnehmen zu können, müssen sie über einen passenden Rezeptor Kontakt zum jeweiligen Antigen bekommen.

Während über die Immunglobulinnatur des B Zell-Rezeptors Einigkeit besteht (2, 48, 63, 74, 79), und dieser leicht durch Immunfluoreszenz und Immunoautoradiographie nachgewiesen werden kann (47, 51, 52), sind die Ansichten über die Natur des T Zell-Rezeptors weiterhin kontrovers.

Im Folgenden sollen die wichtigsten zur Zeit diskutierten T Zell-Rezeptor Theorien dargestellt und mit den beschriebenen Versuchsergebnissen verglichen werden.

1. Spezifität des T Zell-Rezeptors

Schon 1969 zeigten SCHLOSSMAN et al.(69) bei Versuchen mit DNP-Nonalysin, daß T Lymphozyten vom Meerschweinchen unterschiedliche Stellungen der DNP-Gruppe oder eines Lysins unterscheiden können.

BECKER et al. (6) und ALKAN et al. (3) konnten ebenfalls mit geringfügig voneinander abweichenden Molekülen die ausgeprägte Spezifität des T Zell-Rezeptors nachweisen. Das Repertoir der T Lymphozyten scheint demnach nicht geringer als das der B Lymphozyten zu sein.

RAJEWSKY und Mitarbeiter (53, 54) kommen aus ihren Untersuchungen über Kreuz-Induktion und Kreuz -Toleranz verschiedener Albumine auf der Ebene von T und B Lymphozyten zu dem Schluß, daß B und T Zellen die gleich ausgeprägte Spezifität besitzen, die gleichen antigenen Determinanten erkennen und dasselbe System antigenbindender Rezeptoren haben.

Auch ROELANTS et al. (65) kommen bei ihren Arbeiten mit Doppelmarkierungen zu dem Schluß, daß B und T Zellen das gleiche Antigen binden.

Dem stehen Untersuchungen von SENYK et al. (70), GOODMAN (23), ROELANTS (64) und ALKAN (4) mit besser definierten Antigenen gegenüber.

Wie ALKAN et al. (4) zeigen, führt das N-terminale Ende von Rinderglukagon im Meerschweinchen zu einer B Zell Stimmulation und Antikörperproduktion, während das Carboxyl-terminale Ende zelluläre Reaktonen stimmuliert.

Diese widersprüchlichen Befunde lassen allerdings nicht darauf schließen, daß B und T Zell-Rezeptor völlig verschiedenen Molekülklassen angehören; - denkbar ist, daß ähnliche Rezeptoren mit verschiedener Spezifität von beiden Subpopulationen exprimiert werden.

2. Immunglobulin auf T Lymphozyten

Selbst wenn man B und T Lymphozyten ein gleich großes Repertoir an Spezifitäten zugesteht, wird die Kontroverse über die Natur des T Zell-Rezeptors dadurch aufrecht erhalten, daß mit normalem (Säugetier) anti-Ig-Antikörper kaum Immunglobulin auf T Zellen nachgewiesen werden kann.

So konnten CRONE et al. (18) mit gegen die leichte Kette des Hühner Ig Moleküls gerichtetem Kaninchen-Antikörper die für die GvH-Reaktion verantwortlichen Zellen nicht aus einer Mischpopulation absondern oder die GvH-Reaktion selbst beeinflussen.

Auch mit der Immunfluoreszenztechnik läßt sich kein Immunglobulin auf T Lymphozyten nachweisen.
Einige Autoren bestreiten deshalb den Nachweis von Oberflächenimmunglobulin auf T Zellen (50, 77).

Andere (29, 73) wiesen Immunglobulin auf aktivierten T Zellen nach, meinen aber, daß mindestens ein Teil davon von B Zellen stammt und über Fc-Rezeptoren passiv gebunden ist (34, 84).

Ein dritte Gruppe von Autoren konnte jedoch mit emphindlicheren Techniken Determinanten auf T Zellen nachweisen, die mit anti-Ig- Antikörpern kreuzreagieren. NOSSAL et al. (45) z.B. mit der indirekten Immunoautoradiographie, HÄMMERLING und RAJEWSKY (26) elektronenmikroskopisch, und MARCHALONIS et al. (39) beschrieben die Isolation von Ig von T Zellen mit der Lactoperoxidase Technik. Auch FELDMANN (22) und CONE (15) isolierten von aktivierten T Zellen IgM Moleküle mit ausgeprägter Spezifität.

Die Arbeiten von RIETHMÜLLER et al. (60) zeigen, daß mit univalentem KaMIgG F(ab) T Zell Funktionen wie die GvH-Reaktion unterdrückt werden.

Ebenso geht aus Arbeiten von RIEBER und RIETHMÜLLER (59) hervor, daß bivalenter KaMIgG-Antikörper und sein univalentes F(ab) - Fragment an T Lymphozyten gebunden und nach längerer Inkubation in höhermolekularen Komplexen von den Zellen wieder freigesetzt werden.

Auch die von ROELANTS et al. (65) beschriebene Induktion von Capping durch Ig-anti-Ig, Ig-anti-μ oder Ig-anti-L-Kette und die Inhibition einer Antigenbindung an T Zellen durch dieselben Antikörper weist auf Immunglobulin auf T Zell Oberflächen hin.

3. Ist das Immunglobulin auf T Zellen der Rezeptor?

Um Aussagen über einen Rezeptor machen zu können, müssen entsprechende Moleküle nicht nur markiert werden können, sondern auch in funktionellen Tests untersucht werden.

Gerade aufgrund funktioneller Untersuchungen kommen verschiedene Arbeitsgruppen jedoch zu verschiedenen Aussagen. So schließen SIMONSEN et al. (18) aus dem Befund, daß Kaninchen-anti-Hühner-l-Ketten-IgG (KaCh-L-chain-IgG) eine GvH-Reaktion nicht inhibiert, auf eine möglicherweise "archaische Struktur" des T Zell-Rezeptors, die nicht mit dem Serum-Ig kreuzreagiere. Diese Autoren schlagen als Kandidaten für den T Zell-Rezeptor die Histokompatibilitätsantigene selbst vor. Untermauert wird diese Hypothese durch die Hemmung der GvH-Reaktion mit Antikörpern gegen

Antigene des B-locus bei Hühnern (SIMONSEN (18)) und CEPPELLINIS (14) Untersuchungen in der humanen MLC.

Auch andere Autoren (7,71) schlagen aus diesem Grund Moleküle vor, die durch Gene determiniert sind, die mit dem Haupthistokompatibilitätslocus der Spezies verbunden sind.

Grundsätzlich bieten sich verschiedene Tests zur Untersuchung von T Zell Funktionen an:
Die gemischte Lymphozytenkultur (MLC) erlaubt in vitro Untersuchungen über die Erkennungsphase (72, 76),
die GvH-Reaktion über Erkennungs- und Effektormechanismus und
der zytotoxische Test über die Effektorphase alleine.

Allen Methoden gemeinsam ist, daß für die jeweilige Reaktion längere Zeit nötig ist (5 Stunden bis mehrere Tage). Die an der Reaktion beteiligten Zellen sind jedoch in einem dynamischen Zustand. So finden CONE et al. (16) eine aktive Freisetzung von Oberflächenproteinen, deren Geschwindigkeit für verschiedene Proteine unterschiedlich groß ist (32, 46).
T Zellen geben ihnen zufolge ihre Oberflächenproteine drei mal schneller ab als B Zellen.

RIEBER und RIETHMÜLLER (58) beschreiben, daß 120 Minuten nach Bindung von IgG an T Zellen 50 % der gebundenen Antikörper als höhermolekulare Komplexe freigesetzt sind.
Für das Shedding des Ig auf T Lymphozyten geben WILSON et al. (81) eine Halbwertszeit von drei Stunden an.

Neben dem Shedding können Phänomene wie Capping und Neusynthese von Rezeptoren die Analyse der Hemmungen

erschweren oder gar unmöglich machen. TAYLOR, DUFFUS, RAFF und DE PETRIS (75) zeigten, daß eine Vernetzung von Oberflächenproteinen durch Antikörper zum Konfluieren dieser Proteine an einer Stelle der Zelloberfläche führt. Diese sogenannten polar caps werden dann durch Pinozytose von der Oberfläche entfernt (19) oder aktiv freigesetzt.

LOOR et al (37) zeigten, daß nach Kontakt mit anti-Ig-Serum und Capping eine schnelle Resynthese neuer Oberflächen-Ig-Moleküle einsetzt.

Um die Maskierung einer Inhibition der zytotoxischen Aktivität durch solche Vorgänge auszuschalten, wurde für Hemmversuche mit Antikörpern als mögliche Methode zur Untersuchung von Rezeptoren ein Kurzzeittest entwickelt. Aggressorzellen wurden dabei durch eine 1o minütige Inkubation bei 44^{o}C selektiv inaktiviert (FIG. 2, FIG. 4).

3O Minuten Interaktion von Aggressorzellen und Zielzellen vor Inaktivierung erwies sich als lange genug, um nach 4 Stunden Lyse zwischen 3O % und 6O % Zytotoxizität zu erhalten, -andrerseits tritt in diesen 3O' Interaktion noch kein neusynthetisierter Rezeptor an Zelloberflächen auf, deren Oberflächenproteine durch Einwirkung von Antikörpern "polar caps" gebildet haben (LOOR und FORNI, 37).

Aufgrund der vielfältigen Nachweise von Ig auf T Zellen wurde untersucht, ob sich in diesem Kurzzeitsystem der T Zell-Rezeptor mit anti-Ig-Antikörpern blockieren läßt.

Wie TAB. 2 und 3 zeigen, führte keine der getesteten IgG-anti-IgG-Präparationen zu einer Hemmung der Zytotoxizität unter die Werte von Mediumkontrolle oder Normal-IgG.

Die Ursachen für dieses "Versagen" können verschieden sein und jeder der aufgeführten Rezeptortheorien als Argument dienen:

1. Der T Zell-Rezeptor ist kein Ig sondern ein Produkt des H-2 Lokus (18) oder des Ir (Immun response) Gens.
2. Der Rezeptor ist ein Ig einer neuen Klasse (40, 66, 80)
3. Da bei der Immunisierung mit IgG das Fc-Fragment sehr viel immunogener ist als das F(ab)-Fragment, haben die benützten Antikörper zu geringe Spezifität.
4. Der T Zell-Rezeptor ist ein Ig-Molekül, das so in die Membran eingelassen ist, daß seine stark antigenen Determinanten nicht zugänglich sind, daher keine Blockade durch "normale" KaMIgG-Antikörper (s.FIG. 8).

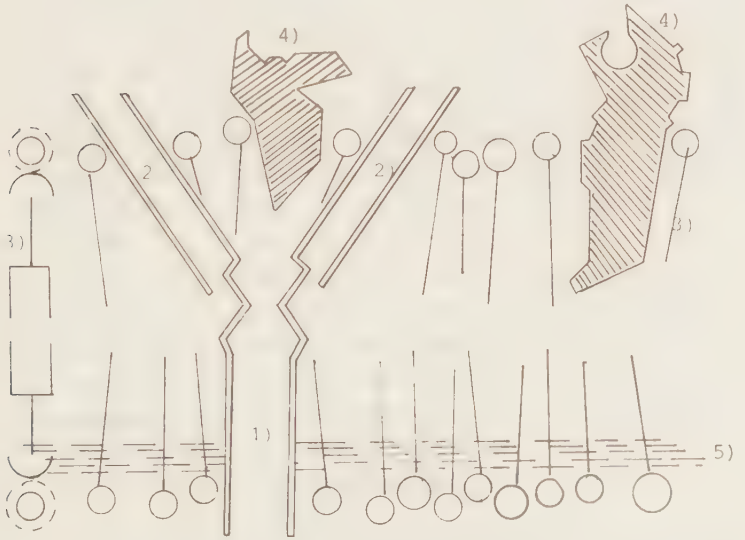

FIG. 8: Modell für ein in die Zellmembran "eingelassenes" Immunglobulin.

1) Fc-Fragment
2) F(ab)-Fragment
3) Lipoproteide
4) andere Antigene
5) evtl. kontraktile Elemente

Diese letzte Hypothese wird gestützt durch Untersuchungen von BINZ und WIGZELL (8), RAMSEIER (55) und BINZ et al. (9, 10, 11) mit Anitkörpern gegen idiotypische Determinanten.

Im Gegensatz zu KaMIgGIgG ergab KaMTIgG in allen Versuchen eine konzentrationsabhängige Inhibition der Zytotoxizität, die bis zur vollständigen Hemmung bei 1 mg Protein/ml reichte (TABELLE 4).

Die immunsupressive Wirkung von Antilymphozytenglobulinen in vivo und in vitro wurde vielfach beschrieben (1, 30, 35, 36, 82), jedoch immer mit der Fähigkeit zur Komplementbindung in Zusammenhang gebracht (61,62, 83).
Die hier aufgeführten Versuche wurden aber alle im komplementfreien System durchgeführt, so daß eine Inhibition durch Zerstörung der T Lymphozyten ausscheidet.

Als Erklärungsmöglichkeiten kommen daher in Betracht:

a) sterische Inhibition; dies wäre bei der Vielzahl der antigenen Determinanten, gegen die AMT-Globuline gerichtet sind, durchaus denkbar. Da aber nach WILSON et al. (81), ROELANTS (65) und DE PETRIS (19) Capping und Resynthese verschiedener Antigene, wie z.B. Ig und Histokompatibilitätsantigene, unabhängig voneinander bei Vernetzung auftritt, bedeutete dies auch, daß der ^{51}Cr-Release-Test in seiner Modifikation als Kurzzeittest grundsätzlich zur Untersuchung des T Zell-Rezeptors geeignet ist und Capping mit anschließender Rezeptorneusynthese ausschließt.

b) Das KaMTIgG enthält anti-Rezeptor-Aktivität.
BINZ und WIGZELL (8) zufolge ist zu fordern, daß

diese Antikörper mit anti-P 815-Antikörpern präzipitierbar sind.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse läßt sich nicht endgültig entscheiden, welche der beiden Möglichkeiten zutrifft; hierzu sind vielmehr Versuche mit B Zellen-absorbiertem AMT-IgG nötig, ebenso mit Absorptionen durch aktivierte Zellen anderer Inzuchtstämme und mit idiotypischen Antikörpern.

Die Frage nach der Natur des T Zell-Rezeptors kann anhand der vorliegenden Ergebnisse weder zu Gunsten noch zu Ungunsten des Immunglobulins beantwortet werden. Wie gezeigt wurde, kann das Ausbleiben einer Rezeptorblockade durch anti-Ig-Antikörper durch mehrere Umstände bedingt sein (Spezifität des Antikörpers, versenkter Einbau des Moleküls etc.).

Der ^{51}Cr-Release-Test stellt jedoch in seiner Modifikation als Kurzzeittest für weitere Untersuchungen, insbesondere mit spezifischeren Antikörpern (z.B. anti-idiotypischen),ein brauchbares System für die Suche nach dem T Zell-Rezeptor dar.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. C 57/Bl Mäuse (H-2b) wurden mit P 815 Mastozytomzellen ip. immunisiert. Die stärkste zellvermittelte Zytotoxizität wurde bei den immunisierten Tieren am 10. Tag nach der Immunisierung festgestellt.

2. Der ^{51}Cr-Release-Test wurde zu einem Mikro-Kurzzeitsystem modifiziert, in dem nach 30' Interaktion von immunen Milzzellen und Tumorzellen die Aggressorzellen selektiv inaktiviert wurden. Die Bindung von Antikörpern an antigene Determinanten von Aggressorzellen (z.B. Rezeptoren) und daraus folgende Inhibition der zytotoxischen Aktivität wurde in diesem System nicht durch "Capping" oder "Shedding" maskiert.

3. Es wurde versucht, Antigen-Rezeptoren auf T Zellen im Kurzzeitsystem mit anti-IgG-Antikörpern zu blockieren. Dabei ergab Kaninchen-anti-Maus-IgG-IgG und Kaninchen-anti-Maus-IgG-Serum keine Minderung der zytotoxischen Aktivität immuner Milzzellen gegenüber Mediumkontrolle und normalem Kaninchen-Serum.

4. Mit Kaninchen-anti-Mausthymus-IgG ergab sich eine konzentrationsabhängige Inhibition der Zytotoxizität immuner Milzzellen. Ob diese Inhibition durch spezifische Blockade der Antigen-Rezeptoren oder durch sterische Hinderung zustande kommt, kann auf Grund der vorliegenden Ergebnisse nicht entschieden werden.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S S

1. ABAZA H.M., NOLAN B., WATT G. and WOODRUFF M.F.A.: Effect of antilymphocytic serum on the survival of renal homotransplants in dogs. Transplant. 4,:618 (1966)

2. ADA L.: Antigen binding cells in tolerance and immunity. Transplant. 5,:105 (1970)

3. ALKAN S.S., WILLIAMS E.B., NITECKI D.E. and GOODMAN J.W.: Antigen recognition and the immune response: Humoral and cellular immune response to small mono- and bifunctional antigen molecules. J. Exp. Med. 135,: 1228 (1972)

4. ALKAN S.S., NITECKI D.E. and GOODMANJ.W.: Antigen recognition and the immune response: The capacity of L-tyrosine-azobenzenearsonate to serve as a carrier for a macromolecular hapten. J. Immunol. 107,: 353 (1971)

5. AMOS D.B. and PEACOCKE N.:Leukoagglutination. A modified technique and preliminary results of absorption with tissues. in 'Proc. 9th Congr. Europ. Soc. Haemat.', Lissabon, Basel, N.Y., :1132, (1963) S. Karger.

6. BECKER M.J., SEVIN H. and SELA M.: The specifity of cellular immunity: Studies in guinea pigs using defined tetrapeptides containing p-azobenzenearsonate-L-tyrosine. Eur.J.Immunol. 3,:131 (1973)

7. BENACERRAF B. and MC DEVITT H.O.: Histocompatibility-linked immune response genes. Science (Wash.D.C.) 175,:273 (1972)

8. BINZ H. and WIGZELL H.: Shared Idiotypic Determinants on B and T Lymphocytes Reactive against the same Antigenic Determinants. I. Demonstration of Similar or Identical Idiotypes on IgG Molecules and T-Cell Receptors with Specifity for the Same Alloantigens. J.Exp.Med. 142,:197 (1975)

9. BINZ H., LINDEMANN J. and WIGZELL H.: Inhibition of local graft-versus-host reaction by anti-alloantibodies. Nature (Lond.) 246,:146 (1973)

10. BINZ H., LINDEMANN J. and WIGZELL H.: Cell-bound receptors for alloantigen on normal lymphocytes. I. Characterization of receptor-carrying cells by the use of antibodies to alloantibodies. J.Exp.Med 4,:877 (1974)

11. BINZ H., LINDEMANN J. and WIGZELL H.: Cell-bound receptors for alloantigen on normal lymphocytes. II. Antialloantibody serum contains specific factors reacting with relevant immunocompetent T lymphocytes. J.Exp. Med. 140,:731 (1974)

12. BOYSE E.A., OLD L.J. and CHOUROULINKOV J.: Cytotoxic test for demonstration of mouse antibody. in 'Methods in Medical Research', Vol 10, :39 (1964) Year Book Medical Publishers, Inc. Chicago, H.N.EISEN Ed. in chief.

13. BRUNNER K.T., MAUEL J., CEROTTINI J.C. and CHAPIUS B.: Quantitativ assay of the lytic action of lymphoid cells on 51Cr-labeled allogeneic target cells in vitro. Immunology 14,:183 (1967)

14. CEPPELLINI R., MIGGIANO M., CURTONI E.S. and PELLEGRINO M.: Mixed leukocyte cultures and HL-A antigens. II. Inhibition by anti-HL-A sera. Transplant Proc. 3,:63 (1971)

15. CONE R.E., SPRENT J. and MARCHALONIS J.J.: Antigen binding specificity of isolated cell surface immunoglobulin from thymus cells activated to histocompatibility antigen. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 69,:2556 (1972)

16. CONE R.E., MARCHALONIS J.J. and ROLLEY R.T.: Lymphocyte Membrane Dynamics. Metabolic Release of Cell Surface Proteins. J.Exp. Med. 134,:1373 (1971)

17. COOPER M., PETERSON D.R.A., SOUTH M.A. and GOOD R.A.: The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. J.Exp.Med. 123,:75, (1966)

18. CRONE M., KOCH C. and SIMONSEN M.: The elusive T cell receptor. Transplant. Rev. 10,:36 (1972)

19. DE PETRIS S. and RAFF M.C.: Distribution of immunoglobulin on the surface of mouse lymphoid cells as determined by immunoferritin electron microscopy. Antibody-induced, temperature-dependent redistribution and its implications for membrane structure. Eur. J. Immunol. 2,:523 (1972)

20. DUNN T.B. and POTTER M.: A transplantable mast-cell neoplasma in the mouse. J.nat. Cancer Inst., 18,:587 (1957)

21. FAHEY J.L. and TERRY E.W.: Ion exchange chromatography and gel filtration. in,: 'Handbook of Exp. Immunology ', ed. WEIR D.M., 2 nd edition (1973). Blackwell. Oxford, London ,Edinburgh Melbourne.

22. FELDMANN M.: Cell interaction in the immune response in vitro. V.Specific collaboration via complexes of antigen and T cell immunoglobulin. J.Exp.Med. 136,:737 (1972)

23. GOODMAN J.W., NITECKID.E.,:Studies on the Relation of a Prior Immune Response to Immunogeicity. Immunology 13,:577 (1967)

24. GOWANS J.L. and MC GREGOR D.D.: The immunological activities of lymphocytes. Progr. Allergy 9,:1 (1965)

25. GRAEVES M.F.: Biological effects of anti-immunoglobulins: Evidence for immunoglobulin receptors on "T" and "B" lymphocytes. Transplant. Rev. 5,:45 (1970)

26. HÄMMERLING U. and RAJEWSKY K.: Evidence for surface associated Iq on T and B lymphocytes. Eur. J. Immunol. 1,:447 (1971)

27. HEIDE H. und HAUPT K.: Darstellung noch nicht therapeutisch angewandter Plasmaproteine. Behringwerke Mittl 43,:161 (1964)

28. HENNEY C.S. and BUBBERS E.J.: Studies on the Mechanism of Lymphocyte-mediated Cytolysis. I.The Role of Divalent Cations in Cytolysis by T Lymphocytes. J. Immunol. 110,1,:63 (1973)

29. HUDSON L., SPRENT J., MILLER J.F.A.P. and PLAYFAIR J.H.L.: B-cell derived immunoglobulin on activated mouse T-lymphocytes. Nature 251,:60 (1974)

30. IWASAKI Y., PORTER K.A., AMEND J.R., MARCHIORO T.L., V.ZUHLKE V. and STARZL T.E.: The preparation and testing of horse anti dog and anti human antilymphoid plasma or serum and its protein fraction. Surgery Gynec. Obstet. 124,:1 (1967)

31. KENDALL F.E.: The use of immunochemical methods for the identification and determination of human serum proteins. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 6,:376 (1938)

32. KIEHN E.D. and HOLLAND J.J.: Membrane and nonmembrane proteins of mammalian cells. Synthesis, turnover and size distribution. Biochemistry 9, :1716 (1970)

33. KUNKEL H.G. and TRAUTMANN R.: Zone Electrophoresis in various types of supporting media. in 'Electrophoresis':266 (1959), ed. M. BIER, Academic Press, N.Y.

34. LEE S.T., PARASKEVAS G.:Cell surface associated gamma-globulins in lymphocytes. IV. Lack of detection of surface gamma globulin on B-cells and apuisition of surface gamma globulin by T-cells and during primary response. J. Immunol. 109,:1262 (1972)

35. LEVY R.H. and MEDAWAR P.B.: Nature and mode of action of antilymphocytic antiserum. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 56,:1130 (1967)

36. LEVY R.H. and MEDAWAR P.B.: Further experiments on the action of antilymphocytic antiserum. Proc.Nat. Acad. Sci. USA 58,:470 (1967)

37. LOOR F., FORNI L. and PERNIS B.: The dynamic state of the lymphocyte membrane. Factors affecting the distribution and turnover of surface immunoglobulins. Europ. J. Immunol. 2,:203 (1972)

38. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193,:265 (1951)

39. MARCHALONIS J.J., CONE R.E. and ATWELL J.L.: Isolation and partial characterization of lymphocyte surface immunoglobulins. J.Exp.Med. 135, :956 (1972)

40. MARCHALONIS J.J. in: The immune system. Genes, receptors, signals. eds. SERCARZ E.E., WILLIAMSON A.R. and FOX C.F. (Academic Press, New York and London, 1974):141

41. MILLER R.G.: Quantitative analysis of the ^{51}Cr release cytotoxicity assay for cytotoxic lymphocytes. Fed. Proc. 33,:779 (1974)

42. MILLER R.G. and DUNKLEY M.: Quantitative Analysis of the 51Cr Release Cytotoxic Assay for Cytotoxic Lymphocytes. Cell. Immunol. 14, 294 (1974)

43. MÖLLER G.: Demonstration of mouse isoantigens at cellular level by fluorescent antibody technique. J.Exp.Med. 114,:415 (1961)

44. NAGAYA H. and SIEKER H.O.: Allograft survival: effect of antiserums to thymus glands and lymphocytes. Science 150,:1181 (1965)

45. NOSSAL G.J.V., WARNER N.L., LEWIS H. and SPRENT J.: Quantitative features of a sandwich radioimmunolabeling technique for lymphocyte surface receptors. J.Exp. Med. 135,:405 (1972)

46. OMURA T., SIEKEVITZ P. and PALADE G.E.: Turnover of constituents of the endoplasmic reticulum membranes of rat hepatocytes. J.Biol. Chem. 242,:2389 (1967)

47. PERNIS B., FORNI L. and AMANTE L.: Immunoglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes. J.Exp.Med. 132,:1001 (1970)

48. PERNIS B., FERRARINI M., FORNI L. and AMANTE L.: Immunoglobulins on lymphocyte membranes. Progr. Immunol. 1,:95 (1971)

49. PORATH J., AXEN R. and ERNBACK S.: Chemical coupling of proteins to agarose. Nature 215,:1491 (1967)

50. RAFF M.C.: Two distinct populations of peripheral lymphocytes in mice distinguis hable by immunfluorescence. Immunology 19,:637 (1970)

51. RAFF M.C., STERNBERG M. and TAYLOR R.B.: Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells. Nature (Lond.) 225,:553 (1970)

52. RAFF M.C.: Two distinct populations of peripheral lymphocytes in mice distinguishable by immunofluorescence. Immunology 19,:137(1970)

53. RAJEWSKY K. and POHLIT H.: Specifity of helper function. Progr. Immunol. 1,:337 (1971)

54. RAJEWSKY K. and MOHR R.: Specifity and heterogeneity of helper T-cells in the response to serum albumins in mice. Eur.J.Immunol. 4,:111 1974)

55. RAMSEIER H. and LINDEMANN J.: Similarity of cellular recognition structures for histocompatibility antigens and of combining sites of corresponding alloantibodies. Eur. J. Immunol. 2,:109 (1972)

56. RIEBER E.P.: Versuche zur Wirkungsweise von heterologen Antilymphozytenglobulinen. Tübingen (1969)

57. RIEBER E.P., RIETHMÜLLER G. and HADAM M.: Demonstration of surface-Ig on thymus cells. In: XXI st Colloquium: Proteides of the Biological Fluids. Oxford. Pergamon Press Ltd. (1972)

58. RIEBER E.P. and RIETHMÜLLER G.: Surface Immunoglobulin on Thymus Cells. I.Increased Immunogenicity of Heterologous Anti-Ig Bound to Thymus Cells. Z. Immun.Forsch. 147,: (1974)

59. RIEBER E.P. and RIETHMÜLLER G.: Surface Immunoglobulin on Thymus Cells II. Release of Heterologous Anti-Ig-Antibodies from Thymus Cells as an Immunogenic Complex. Z.Immun.Forsch.147,:276 (1974)

60. RIETHMÜLLER G., RIEBER E.P. and SEEGER I.: Suppression of graft versus host reaction by univalent anti-immunoglobulin antibody. Nature (Lond.) 230,:248 (1971)

61. RIETHMÜLLER G., RIEBER E.P. and RIETHMÜLLER D.: Effect of intact and of pepsin-digested anti-mouse-thymus-IgG on antibody-forming spleen cells and on the homograft reaction. Abstracts of the First Internat. Congr. of the Transplantation Soc. :155, (1967) (Paris)

62. RIETHMÜLLER G., RIETHMÜLLER D. und RIEBER E.P.: Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von heterologen Antilymphozyten-Globulinen. Klin. Wschr. 1968,:44

63. ROELANTS G.E.: Antigen recognition by B and T lymphocytes. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 59, 135 (1972)

64. ROELANTS G.E., SENYK G. and GOODMAN J.W.: Immunochemical studies on the Poly-γ-D-Glutamyl capsule of Bacillus Anthracis. Isr.J. Med.Sci. 5,:196 (1969)

65. ROELANTS G.E., FORNI L. and PERNIS B.: Blocking and redistribution ("capping") of antigen receptors on T and B lymphocytes by anti-immunoglobulin antibody. J.Exp.Med.137,:1060 (1973)

66. ROELANTS G.E.: Recognition of Antigen by T Lymphocytes. In: Molecular Approaches to Immunology, Miami Winter Symposia, 9,:55 (1975), Edd. SMITH E.E. and RIBBONS D.W., Academic Press (1975)

67. SCHACTERLE G.R. and POLLOCK R.L.: A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. Anal.Biochem.51, :654 (1973)

68. SCHEIDEP J.J.: Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse. Int. Arch.Allergy Appl. Immunol. 7,:103 (1955) Basel. Ed.: P. Kallos.

69. SCHLOSSMAN L.F., HERMAN J. and YARON A.: Antigen recognition: In vitro studies on the specifity of the cellular immune response. J.Exp.Med. 130,:1031 (1969)

70. SENYK G., WILLIAMS B., NITECKI D.E. and GOODMAN J.W.: The functional dissection of an antigen molecule: Specifity of humoral and cellular immune responses to Glucagon. J.Exp.Med. 133,:1294 (1971)

71. SHEVACH E.M.,GREEN I. and PAUL W.E.: Alloantiserum-induced inhibition of immune response gene product function. II.Genetic analysis of target antigens. J.Exp.Med. 139,:679 (1974)

72. SØRENSEN S.R.: The mixed lymphocyte culture. Interaction, techniques and immunogenetics. Acta Pathol. Microbiol. Scand. (B) suppl 230 (1972)

73. SPRENT J. and HUDSON L.: Surface Immunoglobulin on H-2-activated T Lymphocytes. Transplant. Proc. V,4,:1731 (1973)

74. SULITZEANU D.: Antibody-like receptors on immunocompetent cells. Curr.Top. Microbiol. Immunol. 54,:1 (1971)

75. TAYLOR R.B., DUFFUS W.P.H., RAFF M.C. and DE PETRIS S.: Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. Nature (New Biol.) (Lond.) 233,:225 (1971)

76. VAN ROOD J.J., KOCH C.T., VAN HOFF J.P.: Graft survival in unrelated donor-recipient pairs matched for MLC and HL-A. Transplant. Proc. 5,:409 (1973)

77. VIETTA E.S., BIANCO C., NUSSENZWEIG V., and UHR J.W.: Cell Surface Immunoglobulin. IV. Distribution among Thymocytes, Bone Marrow Cells and their derived Populations. J.Exp.Med. 136,:81 (1972)

78. WAGNER H. and RÖLLINGHOFF M.: T-cell mediated cytotoxicity: discrimination between antigen-recognition, lethal hit and cytolytic phase. In press.

79. WARNER N.L.: Membrane Immunoglobulins and Antigen Receptors on B and T Lymphocytes. Adv. Immunol. 19,:67 (1974)

80. WIGZELL H.: On the relationship between cellular and humoral antibodies. Contemp. Top. Immunobiol. 3,:77 (1973)

81. WILSON J.D., NOSSAL G.J.V. and HEATHER LEWIS: Metabolic characteristics of lymphocyte surface immunoglobulins. Eur. J. Immunol. 2,:225 (1972)

82. WOODRUFF M.F.A. and ANDERSON N.F.: The effect of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula and administration of antilymphocytic serum on the survival of skin homografts in rats. Ann. N.Y.Acad. Sci. 120,119 (1964)

83. WOODRUFF M.F.A., JAMES K., ANDERSON N.F. and REICH B.L.: In vivo and in vitro properties of anti-lymphocytic serum. In 'Antilymphocytic Serum', Ciba Foundation Study Group No. 29, ed. WOLSTENHOLME G.E.W. and O'CONNOR M.O.. London: J.&A.Churchill, :57 (1967)

84. YOSHIDA T.O., ANDERSON B.: Evidence for a receptor recognizing antigen complexed immunoglobulin on the surface of activated mouse thymus lymphocytes. Scand.J.Immunol. 1.:401 (1972)

Herrn Prof.Dr. Riethmüller danke ich für die Überlassung des Themas und viele hilfreiche Diskussionen. Herrn Dr.R.P.Linke, Dr.P.Rieber und Dr.J.Saal bin ich für zahlreiche Hinweise und anregende Gespräche dankbar. Ebenso gilt mein Dank Mrs. E.Hancock und den Med.Techn. Assistentinnen der Abteilung für Experimentelle Chirurgie und Immunologie.

Lebenslauf

Am 24.12.1949 wurde ich, Gerhard Müller-Schwefe, als Sohn des Prof. Dr. Gerhard Müller-Schwefe und der Martha Müller-Schwefe geb.Klein in Dußlingen/Tbg. geboren.

Die Grundschule besuchte ich in Göttingen und Tübingen, anschließend bis zum Abitur (1969) die University-High-School in Iowa City, Iowa (USA) und das humanistische Uhland Gymnasium in Tübingen.

Nach zwei Semestern Theologie- und Germanistikstudium begann ich mit dem Studium der Medizin. 1973 legte ich die ärztliche Vorprüfung in Tübingen ab, am 20.12.1976 bestand ich das medizinische Staatsexamen.